

公開特許公報

昭53—82792

⑤Int. Cl.² 識別記号 ⑥日本分類 庁内整理番号 ④公開 昭和53年(1978)7月21日
 C 07 D 487/04 // 16 E 61 6736—44
 A 61 K 31/395 30 G 133 7432—44
 C 12 D 9/14 30 H 52 5727—44
 (C 07 D 487/04 36(2) D 531 7110—44
 C 07 D 243/00
 C 07 D 209/00)

(全 24 頁)

④新制癌抗生物質マゼスラマイシン及びその製造方法

②特 願 昭51—157479

②出 願 昭51(1976)12月28日

②発 明 者 梅沢浜夫

東京都練馬区豊玉北4丁目23番地

同 竹内富雄

東京都品川区東五反田5丁目1番11号

②発 明 者 浜田雅

保谷市富士町1丁目7番3号—4

同 国元節子

川崎市高津区宮崎2丁目6番11号

①出 願 人 財団法人微生物化学研究会

東京都品川区上大崎3丁目14番23号

④代 理 人 弁理士 朝内忠夫 外3名

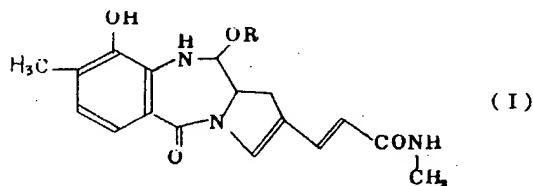
明 細 書

1. 発明の名称

新制癌抗生物質マゼスラマイシン及びその製造方法

2. 特許請求の範囲

1. 次の一般式(I)



〔式中Rは水素原子または低級アルキル基、特にメチル基またはエチル基を示す〕で表わされる化合物またはこれのアンヒドロ体である制癌抗生物質マゼスラマイシン化合物。

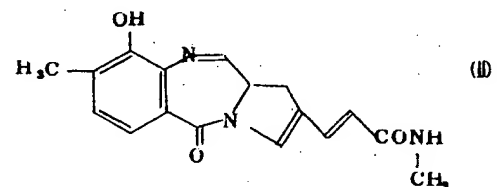
2. 一般式(I)の化合物においてRが水素原子で表わされるマゼスラマイシンAである特許請求の範囲第1項記載の化合物。

3. 一般式(I)の化合物においてRがメチル基で

表わされるマゼスラマイシンBである特許請求の範囲第1項記載の化合物。

4. 一般式(I)の化合物においてRがエチル基で表わされるマゼスラマイシンCである特許請求の範囲第1項記載の化合物。

5. 一般式(I)の化合物のアンヒドロ体であつて次式(II)



で表わされるアンヒドロマゼスラマイシンである特許請求の範囲第1項記載の化合物。

6. ストレプトミセス属に属するマゼスラマイシン化合物生産菌を、栄養源を含有する培地中で好氣的に培養して、その培養物中にマゼスラマイシン化合物を生産せしめ、培養物からマゼスラマイシン化合物を採取することを特徴とする、抗

生物質マゼスラマイシン化合物の製造法。

7. ストレプトミセス・チオルテウス ME 561-24 株 (微工研菌寄第 3825 号) を栄養源培地中で 25-35℃ の温度範囲で好氣的に培養して、その培養物中にマゼスラマイシン化合物を生産せしめる特許請求の範囲第 6 項記載の方法。

8. マゼスラマイシン化合物生産菌の培養物から水非混和性の有機溶剤で抽出によつてマゼスラマイシン化合物を採取する特許請求の範囲第 6 項記載の方法。

9. マゼスラマイシン化合物生産菌の培養液から吸着剤、特に活性炭または多孔質樹脂に吸着せしめてマゼスラマイシン化合物を採取する特許請求の範囲第 6 項記載の方法。

10. マゼスラマイシン化合物を含有する粉末を採取し、この粉末をメタノール又はメタノールを含有する混合溶媒で抽出してマゼスラマイシン B を採取する特許請求の範囲第 6 項記載の方法。

11. マゼスラマイシン B を採取し、非極性溶媒中で脱水して、アンヒドロマゼスラマイシンを採取

する特許請求の範囲第 6 項又は第 7 項記載の方法。

12. アンヒドロマゼスラマイシンを採取し、含水溶媒に溶解して、マゼスラマイシン A を採取する特許請求の範囲第 6 項記載の方法。

13. アンヒドロマゼスラマイシンを採取し、エタノールを含有する溶液に溶解して、マゼスラマイシン C を採取する特許請求の範囲第 6 項記載の方法。

14. マゼスラマイシン A またはアンヒドロマゼスラマイシンをメタノールまたはエタノールと反応させることから成るマゼスラマイシン B または C の製造法。

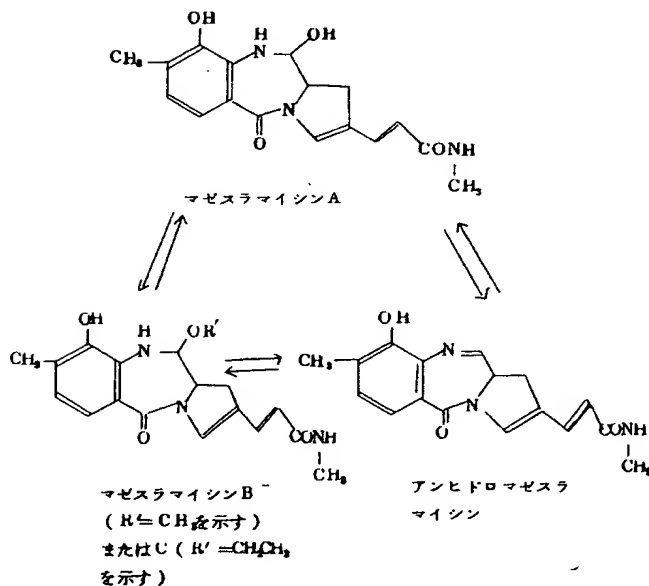
3. 発明の詳細な説明

本発明はストレプトミセス属に属する微生物を培養してその培養物から採取して得られる新規な制癌抗生物質マゼスラマイシン (Mazethramycin) A, B, C およびアンヒドロマゼスラマイシン (以下では、これら新規化合物を総称してマゼスラマイシン化合物若しくは単にマゼスラマイシンと言う) に関し、また、それらのマゼスラマイ

シン化合物の製造方法に関するものである。

本発明者らによれば、昭和 49 年 10 月、東京都新島の上野より分離された放線菌で、ストレプトミセス・チオルテウスと同定された ME 561-24 株を培養してマゼスラマイシンを蓄積せしめ、その培養物からマゼスラマイシンを採取することによつて、新規な制癌抗生物質マゼスラマイシン A, B, C および又はアンヒドロマゼスラマイシンを製造し得ることを知見した。

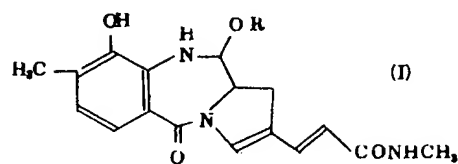
本発明に述べるマゼスラマイシン A, B, C およびアンヒドロマゼスラマイシンは下記の化学構造式をもつ化合物であると認められ、また適宜な溶媒による溶液中で、次の反応式の如く相互に容易に変換する化合物である。



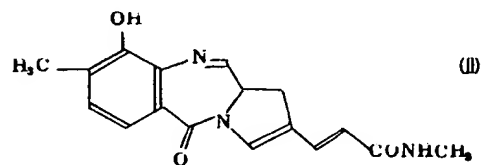
すなわち、マゼスラマイシン A は非極性溶媒中で濃縮して脱水するとアンヒドロマゼスラマイシンとなる。また、アンヒドロマゼスラマイシンは

含水溶媒中で容易にマゼスラマイシンAに変換する。不安定なマゼスラマイシンAまたはアンヒドロマゼスラマイシンは、アルコール性溶媒、すなわちメタノール含有溶液中で、メタノールと反応する結果容易に安定なマゼスラマイシンB、またはエタノール含有溶液中で、エタノールと反応する結果安定なマゼスラマイシンCとなる。従つて、マゼスラマイシン化合物は水性の培養液中では大部分マゼスラマイシンAとして存在することが考えられるが、マゼスラマイシン化合物の採取のために抽出精製する際にアルコール性溶媒を使用してより安定なマゼスラマイシンBまたはマゼスラマイシンCとして採取することが好ましい。マゼスラマイシンA、B、Cおよびアンヒドロマゼスラマイシンは、いずれも細菌、かび類に抗菌作用を示し、特にマウス白血病L-1210細胞およびある種の癌細胞の発育を強く抑制する新抗生物質で、いずれもそれらの作用に本質的差異は認められず、適宜なマゼスラマイシン化合物をそれぞれ同様に制癌剤として用いることができる。

すなわち、第一の本発明の要旨とするところは、次の一般式(I)



(式中Rは水素原子、メチル基、またはエチル基である)、で表わされる化合物、またはこれのアンヒドロ体、すなわち次式(II)



の化合物であるマゼスラマイシン化合物にある。

本発明に係る新制癌抗生物質マゼスラマイシンの性状は次に示すとおりである。

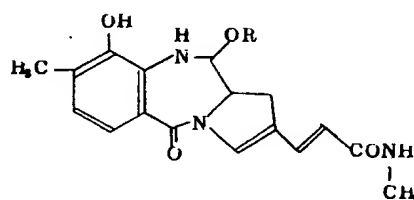
(i) マゼスラマイシンAは淡黄色粉末、融点 $181 \sim 193^\circ\text{C}$ (分解), $[\alpha]_D^{25} + 73.0^\circ\text{C}$ (c 0.062, ジメチルホルムアミド), 紫外吸収スペクトル曲線は第1図に示す通りである。
 $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{CN}}$ m μ (s): 320 (肩 34600), 335 (39400) である。臭化カリウムで測定した赤外吸収スペクトル曲線は第2図に示すとおりである。元素分析は実験値: C 62.35%, H 5.72%, N 12.82%, O 18.99%, 理論値 ($\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4$): C 61.99%, H 5.82%, N 12.76%, O 19.43% であつた。高分解能マススペクトルで分子ピークは認められず、脱水ピークが認められた。重ジメチルスルホキシド溶液で測定した核磁気共鳴スペクトルは次に述べるマゼスラマイシンBのそれと比べ、 $-\text{OCH}_3$ のシグナル (δ 3.44 ppm) の消失、 δ 5.09 ppm (シングレット) と δ 4.83 ppm (ダブルット) に新たなシグナル (1H) が観察された。これは、マゼスラマイシンBにおける $-\text{OCH}_3$ 基が $-\text{OH}$ 基に変換し、エピマーの存在 (約50%) を示した。

(ii) マゼスラマイシンBは黄色針状晶で明確な融点を示さず $245 \sim 270^\circ$ 付近で分解する。比旋光度は $[\alpha]_D^{25} = +90.0^\circ$ (c 0.2, ジメチルホルムアミド) の値を得た。元素分析は実験値: C 63.38%, H 6.18%, N 12.40%, O 18.19%, 理論値 ($\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4$): C 62.96%, H 6.16%, N 12.24%, O 18.64% である。メタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、酢酸エチル、アセトニトリル、クロロホルムには溶解するが、酢酸ブチル、ベンゼン、エーテルには難溶である。呈色反応は、フアストブルーB反応でレンガ色に呈色する。エールリツヒ、坂口、ライドンスミス反応は陰性である。シリカゲルの薄層上で、約10時間放置することにより褐色を呈してくる。シリカゲルの薄層クロマトグラフィーで、クロロホルム-メタノール (10:1) の展開系でRfは0.21である。紫外吸収スペクトル曲線 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) は第3図に示すとおりで、アルカリ溶液中では長波長側へのシフトが認められる。極大吸収は、1%メタノール溶液中で215 m μ (ϵ 25,600)

235 mμ (ε 22, 200) および 334 mμ (ε 46, 100) である。0.1N 水酸化ナトリウム含有1%メタノール溶液中では、258 mμ (肩17, 200) および 351 mμ (ε 43, 400) である。

臭化カリウムで測定した赤外部吸収スペクトル曲線は第4図に示すとおり、3350, 3120, 2950, 1660, 1630, 1610, 1565, 1515, 1465, 1410, 1370, 1345, 1315, 1250, 1220, 1170, 1145, 1070, 1025, 990, 955, 940, 910, 880, 855, 820, 760 cm⁻¹に主な吸収帯を有する。重ジメチルスルホキシイド溶液で測定した核磁気共鳴スペクトルは第5図に示すとおりである。マゼスラマイシンBはその紫外吸収スペクトル、赤外部吸収スペクトルおよび核磁気共鳴スペクトルからアンスラマイシン (ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ 87巻 5791頁~5795頁 / 1965年) ときわめて類似の化合物である。核磁気共鳴スペクトルにおける2重共鳴法よりアン

スラマイシン・メチルエーテルの骨格であるアクリルアミド部分がN-メチル (δ 2.05 ppm) 化された化合物であることが推定される。さらにアンスラマイシン・メチルエーテルのマススペクトルに特徴的に見られる脱メタノールピークはマゼスラマイシンBの高分解能マススペクトルに認められ、さらにマゼスラマイシンBの酸加水分解 (1規定塩酸、加熱還流2時間) 物中にガスクロマトグラフィーによりメチルアミンが検出されることから、マゼスラマイシンA, BおよびCはそれぞれ下記の構造を有する新規な化合物であることを確認した。



マゼスラマイシンA : R = H

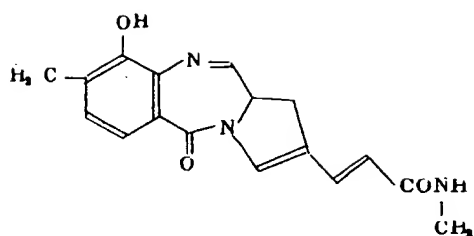
マゼスラマイシンB : R = CH₃

マゼスラマイシンC : R = -CH₂CH₃

(III) マゼスラマイシンCは淡黄色結晶性粉末で融点216~223℃(分解), $[\alpha]_D^{25} +45.0$ (c 0.067ジメチルホルムアミド)。紫外吸収スペクトル曲線は第6図に示す通りである。 $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{CN}}$ mμ (ε): 217 (25,700), 235 (肩19,300), 333 (43,600) である。臭化カリウムで測定した赤外部吸収スペクトル曲線は第7図に示すとおりである。元素分析は、実験値 C 63.25%, H 6.53%, N 12.25%, O 15.83%, 理論値 (C₁₉H₂₃N₃O₄): C 63.85%, H 6.48%, N 11.76%, O 17.91% であつた。重ジメチルスルホキシイド溶液で測定した核磁気共鳴スペクトルは、マゼスラマイシンBのそれと比べ、エチル基のシグナル (-OCH₂-, δ 3.1~3.6 ppm; -CH₃, δ 1.15 ppm) 観察された。

(IV) アンヒドロマゼスラマイシンは、淡黄色結晶で、融点252~262℃(分解), $[\alpha]_D^{25} +$

1940° (c 0.05, ジメチルホルムアミド), 紫外吸収スペクトル曲線は第8図に示す通りである。 $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{CN}}$ mμ (ε): 229 (16,100), 235 (肩15,800), 298 (肩19,300), 315 (21,800), 352 (21,100) である。臭化カリウムで測定した赤外部吸収曲線は第9図に示すとおりである。元素分析は実験値: C 65.04%, H 6.10%, N 13.04%, O 16.38%, 理論値 (C₁₇H₁₇N₃O₃): C 65.58%, H 5.50%, N 13.50%, O 15.42% であつた。高分解能マススペクトルで分子ピーク (実験値 311, 125, 計算値 311, 124) が観察された。重ジメチルスルホキシイド溶液で測定した核磁気共鳴スペクトルはマゼスラマイシンBのそれと比べ、-OCH₃のシグナル (δ 3.44 ppm) が消失し、アゾメチンのシグナル (δ 8.15 ppm) が観察された。アンヒドロマゼスラマイシンは下記の構造を有するマゼスラマイシンAの脱水体であることを確認した。



なお、アンヒドロマゼスラマイシンをメタノール、エタノール、プロピルアルコール、ブタノール等の低級アルコール中に溶解すると、紫外部吸収スペクトルの変化より、アルコール付加物となつてゐることが確認された。しかし、メタノール、エタノール付加物であるマゼスラマイシンBおよびC以外のアルコール付加物は不安定で、減圧下に加熱乾燥(約50℃)するとアンヒドロマゼスラマイシンにもどることが認められた。

マゼスラマイシンA、B、Cならびにアンヒドロマゼスラマイシンの各々の栄養寒天上ででの最低阻止濃度は第1表に示すとおりである。

第1表	供試菌	最低阻止濃度 (mcg/ml)
	スタヒロコッカス・アウレウス 209P	3.12
	スタヒロコッカス・アウレウス・スミス	1.56
	ミクロコッカス・フラバス FDA16	3.12
	ミクロコッカス・リノチイグライクス IF03333	3.12
	サルチナ・ルチア PCI1001	3.12
	バチルス・アンスラシス	6.25
	バチルス・ズブチルス NRRL B.558	3.12
	バチルス・ズブチルス PCI219	1.56
	バチルス・セレウス ATCC10702	6.25
	コリネバクテリウム・ボリス1810	3.12
	エシエリビア・コリ NIHJ	6.25
	エシエリビア・コリ K-12	50
	シガラ・ジセンタリエ JS11910	3.12
	シガラ・フレキシネリ 46JS11811	50
	シガラ・ソナイ JS11746	100
	サルモネラ・チフアイ T-63	50
	サルモネラ・エンテリチイリス 1891	6.25
	プロテウス・フルガリス OX19	50
	プロテウス・レトグリ GN466	50
	シユートモナス・エルギノーザ A3	>50
	クレブシラ・ニユモニエ PCI602	3.12
	カンジダ・ジュードトロポビカリス F-2	6.25
	カンジダ・アルビカリス 3147	725
	カンジダ・グルセイ F-5	750
	サツカロミセス・セレビシエ F-7	725
	タリプトコッカス・ネオホルマンズ F-10	>12.5
	ヘルミンソンスボリウム・オリゼ	>12.5
	ビリダリア・オリゼ	61.25
	キサントモナス・シトリ	725
	キサントモナス・オリゼ	71.56
	アスベルギルス・ニガー F-16	750
	トリコフアイトン・アスチロイデス 429	>12.5

マゼスラマイシン A, B および C のマウスの白血病に対する治療効果をみるため、マウスの腹腔に 10^5 個/マウスの率で $1-12/10$ 細胞を移植後、マゼスラマイシン A, B, C の各々を腹腔内注射で連続 10 日間投与すると第 2 表に示す様な延命効果を示した。

第 2 表

投与量 (mcg/マウス/日)	延命率 (%)
1.25	205
0.63	240
0.31	164
0.16	164
0.08	123

但し延命率は次式によつて計算した。

$$\text{延命率 (\%)} = \frac{(\text{処理マウスの生存日数})}{(\text{未処理マウスの生存日数})}$$

マゼスラマイシン A, B, C ならびにアンヒドロマゼスラマイシンの各々の急性毒性は 10 mg/kg タノール水溶液をマウスの腹腔内に投与して LD₅₀

以上の胞子の連鎖をみとめ、胞子の大きさは $1.0 \sim 1.2 \times 0.4 \sim 0.5$ ミクロン位で、胞子の表面は平滑である。

2 各種培地における生育状態

色の記載について () 内に示す標準は、コンテイナー・コーポレーション・オブ・アメリカのカラー・ハーモニー・マニュアルを用いた。

(1) シュクロース・硝酸塩寒天培地 (27℃ 培養)

無色の発育上に、白色の気菌糸を着生し、溶解性色素はみとめられない。

(2) グルコース・アスパラギン寒天培地 (27℃ 培養)

無色～うす黄～にぶ黄 (1/2 Me, Antique Gold) の発育上に、白～黄味灰 (1 cb, parchment ~ 2cb, Ivory Tint) の気菌糸を着生し、溶解性色素はわずかに黄色味をおびる。

(3) グリセリン・アスパラギン寒天培地 (ISP-培地 5, 27℃ 培養)

うす黄～うす黄茶 (3 ng, Yellow Maple) ~ 黄茶 (3 pl, Golden Brown ~ 4pi Oak Brown) の

0.8 mg/μl である。

なお、本発明におけるマゼスラマイシン A, B, C およびアンヒドロマゼスラマイシンの間では、これらの生物学的性質はそれぞれ本質的差異を示さない。

第二の本発明の要旨とするところは、ストレプトミセス属に属するマゼスラマイシン化合物生産菌を、栄養源を含有する培地中で好氣的に培養して、その培養物中にマゼスラマイシン化合物を採取することを特徴とする、抗生物質マゼスラマイシン化合物の製造法にある。

第二の本発明で使用されるマゼスラマイシン化合物生産菌の一例としては、ストレプトミセス・チオルテウス ME 561-84 株がある。ME 561-84 株の菌学的性状は次に示すとおりである。

1 形態

ME 561-84 株は顕微鏡下で、分枝した基中菌糸より輪生枝をもつた気菌糸を伸長し、螺旋形成はみとめられない。成熟した胞子鎖は 10 個

発育上に、白～黄味灰 (1ba Yellow Tint ~ 2ba Pearl) の気菌糸を着生し、溶解性色素は茶色味を呈する。

(4) スターチ・無機塩寒天培地 (ISP-培地 4, 27℃ 培養)

無色～うす黄茶 (3 ng, Yellow Maple) の発育上に、白～黄味灰 (2 cb, Ivory Tint) の気菌糸を着生し、溶解性色素は培養後 15 日目位からわずかに黄色味をおびる。

(5) チロシン寒天培地 (ISP-培地 7, 27℃ 培養)

うす黄茶～黄茶 (2 pi ~ 2 ni, Mustard Brown) ~ 暗い黄茶 (3 pl, Deep Brown) の発育上に、白～黄味灰 (1 ba, Yellow Tint ~ 2ba Pearl) の気菌糸を着生し、溶解性色素は黄色味～茶色味を呈する。

(6) 栄養寒天培地 (27℃ 培養)

うす黄～うす黄茶 (3 ng, Yellow Maple) の発育上に、白色の気菌糸を着生し、溶解性色素は黄色味を呈する。

(7) イースト・麦芽寒天培地 (ISP-培地 2, 27℃

培養)

・うす黄茶～黄茶〔3 ni, Clove Brown〕の発育上に、白～黄味灰〔1 ch, parchment～2 ch Ivory Tint〕の気菌糸を着生し、溶解性色素は、わずかに茶色味をおびる。

(7) オートミル寒天培地 (ISP-培地3, 27℃培養)
うす黄～うす黄茶の発育上に、白～黄味灰〔2 ch Ivory Tint〕の気菌糸を着生し、溶解性色素は黄色味を呈する。

(8) グリセリン・硝酸塩寒天培地 (27℃培養)
無色～うす黄の発育上に、白～黄味灰の気菌糸をうつすらと着生し、溶解性色素はみとめられない。

(9) スターチ寒天培地 (27℃培養)
無色～うす黄茶〔3 ng, Yellow Maple〕の発育上に、白～黄味灰〔2 ch Ivory Tint〕の気菌糸を着生し、溶解性色素は培養後15日目位からわずかに黄色味をおびる。

(10) リンゴ酸石灰寒天培地 (27℃培養)
無色の発育上に、白～黄味灰〔1 ba, Yellow

Tint～2 ba, pearl〕の気菌糸を着生し、溶解性色素はみとめられない。

(11) 単純ゼラチン穿刺培養 (20℃培養)

発育はうす黄～うす黄茶、気菌糸は培養後14日目頃から着生し、黄味灰を呈する。溶解性色素は培養後14日目頃からわずかに黄色味をおびる。

(12) グルコース・ペプトン・ゼラチン穿刺培養 (27℃培養)
にぶ黄～うす黄茶の発育上に、黄味灰の気菌糸をうつすらと着生し、溶解性色素は黄色味をおびる。

(13) 脱脂牛乳 (37℃培養)

うす黄～にぶ黄の発育上に、白～黄味灰の気菌糸を着生し、溶解性色素は黄色味を呈する。

(14) セルロース (27℃培養)

発育は無色、気菌糸は着生せず、溶解性色素もみとめられない。

3 生理的性質

(1) 生育温度範囲

スターチ・イースト寒天 (可溶性澱粉1.0%)

酵母エキス0.2%、組寒天3.0%、pH7.0)を用いて、20℃、24℃、27℃、30℃、37℃、50℃の各温度で試験の結果、50℃を除いて、そのいずれの温度でも生育するが、最適温度は27℃～30℃付近と思われる。

(2) ゼラチンの液化 (1.5%単純ゼラチン、20℃培養; グルコース、ペプトン、ゼラチン、27℃培養)

単純ゼラチンの場合は、培養後5日目頃から液化がみられるが、その作用は中等度～弱い方である。グルコース・ペプトン・ゼラチン培地では、培養後3週間を経過しても液化がみとめられなかった。

(3) スターチの加水分解 (スターチ・無機塩寒天及びスターチ寒天、何れも27℃培養)

培養後10～14日目頃から水解性がみとめられるが、その信用は極めて弱い方である。

(4) 脱脂牛乳の凝固・ペプトン化 (脱脂牛乳、37℃培養) 培養後3日目に凝固が完了し、後ペプトン化が始まり、培養後10日目にペプトン化がほぼ

完了する。凝固、ペプトン化ともにその作用は強い方である。

(5) メラニン様色素の生成 (トリプトン・イースト・ブロス、ISP-培地1; ペプトン・イースト・鉄・寒天、ISP-培地6; チロシン寒天、ISP-培地7、何れも27℃培養)

トリプトン・イースト・ブロスではメラニン様色素の生成はみとめられず、ペプトン・イースト・鉄寒天及びチロシン寒天の場合もわずかに褐色の溶解性色素を呈する程度で、おそらく陰性と思はれる。

(6) 炭素源の利用性 (ブリドハム・ゴトリブ寒天、ISP-培地9、27℃培養)

グルコースを利用して発育し、イノシトールはおそらく利用していると判定され、L-アラビノース、D-キシロース、D-フラクトース、シユクロース、L-ラムノース、ラフィノース、D-マンニトールは利用しない。

(7) リンゴ酸石灰の溶解 (リンゴ酸石灰寒天、27℃培養)

リンゴ酸石灰の溶解はみとめられない。

(1) 硝酸塩の還元反応 (1% 硝酸ソーダ含有ペプトン水、ISP-培地 8, 27 で培養)

陰性である。

以上の性状を要求すると ME 561-84 株はストレプトミセス属に属し、菌糸は輪生枝を有し、螺旋形成はみとめられず、胞子の表面は平滑である。種々の培地で発育はうす黄～うす黄茶～黄茶、気菌糸はおおむね黄味灰を呈し、溶解性色素は無色～黄色味～茶色味をおびる。メラニン様色素は陰性、蛋白分解は中等度～強い方、スターチの水解性は極めて弱い方である。

これらの性状及びこの菌株がオーレオスライシンを生産する点より既知菌種を検索すると、ME 561-84 株に最も近縁の種としてストレプトミセス、チオルテウス

(*Streptomyces thioluteus* 文献 / International Journal of Systematic Bacteriology 22 巻、362 頁、1972; 文献 2 The Japanese Medical Journal / 巻、512 頁、1968) があげられ

る。次に実際にストレプトミセス・チオルテウス ISP 5027 株を入手し、ME 561-84 株と比較検討した成績の概要を示すと次の表 3 の如くである。

表 3

	ME 561-84	ストレプトミセス・チオルテウス ISP 5027	文献記載
輪生枝の形成	+	種々の培地上で	(1)
螺旋形成	-	気菌糸の形成なく不明	(1)
胞子の表面	平滑		平滑 (2)
気菌糸	黄味灰		(1)
発育の色	うす黄～うす黄茶～黄茶	うす黄～うす黄茶～黄茶	あらうす白～黄白色 (1)
溶解性色素	黄味灰～茶色味	黄味灰～茶色味	クリーム～黄白色 (1)
メラニン様色素の生成			黄茶 (1)
ISP-1 培地	-	-	(3)
ISP-6	+	+	(3)
ISP-7	+	+	(3)
スターチの加水分解	極めて弱い	-	(1)
牛乳の凝固	+	+	(1)
ペプトン化	+	+	(1)
ゼラチンの液化	+	+	(1)
単糖セラチン	+	+	(1)
グルコース・ペプトンセラチン	+	+	(1)
硝酸塩の還元反応	-	-	(1)
炭素源の利用性	-	-	(3)
L-アラビノース	-	-	
D-キシロース	-	-	
D-グルコース	+	+	
D-フラクトース	-	-	
シクロロース	-	-	
イノシトール	+	+	
L-サマノース	-	-	
ラフィノース	-	-	
マンニトール	-	-	
生産する抗生物質	オーレオスライシン		オーレオスライシン (1)

注(1): はお花(+), はおそらく-を意味する。

注(2): 文献記載は 1) S.A. Waksman 著の The Actinomycetes, 2 巻、479 頁、1961; 2) Electromicrograms of Actinomycetes No. 16 頁 The Society for Actinomycetes, Japan 1965, 3)

[International Journal of Systematic Bacteriology, 22 巻、362 頁、1972]

上記のごとくストレプトミセス・チオルテウス ISP 5027 株は気菌糸を着生せず、その形態学的性状は不明であつたが、文献によれば輪生枝を有する白あるいは黄味白の気菌糸を形成するとあり、ME561-04 株と同様である。

一方 ME561-04 株はストレプトミセス・チオルテウス ISP 5027 株と比較し、グルコース・ペプトン、ゼラチン、硝酸塩の還元反応で異なるが、その他の点では大変良く一致している。

よつて、ME561-04 株をストレプトミセス・チオルテウス (*streptomyces thioluteus*) ME561-04 と同定した。

なお、この ME561-04 株は工業技術院微生物工業技術研究所に昭和 51 年 11 月 27 日にストレプトミセス ME561-04 の名称で保管委託申請し、申請書受理番号は第 3825 号である。

放線菌は人工的に、又自然界で変異をおこしやすいが、本発明にいうストレプトミセス・チオルテウス ME561-04 はそれらの変異菌のすべ

てを包括する。本発明にいうこれらの菌種はマゼスラマイシン化合物を生産し、不菌種およびその変異菌と明確に区別されない菌はすべてこれを包含する。

第二の本発明の方法を実施するに当つては、マゼスラマイシン生産菌株の胞子または菌糸を栄養源含有培地に接種して、好氣的に発育させることによつて、マゼスラマイシン化合物、特にマゼスラマイシン A を含む培養液が得られる。栄養源としては放線菌の栄養源として用いられる公知のものはすべて使用できる。例えばグルコース、マルトース、デキストリン、澱粉、ラクトース、サツカロース、ガラクトース、グリセリン、大豆油等を炭素源として利用できる。その一例を表 1 に示す。ペプトン 0.75%、肉エキス 0.75%、NaCl 0.3%、CaCO₃ 0.32%、MgSO₄·7H₂O 0.1%、CuSO₄·5H₂O 0.00056%、FeSO₄·7H₂O 0.00008%、MnCl₂·4H₂O 0.00064%、ZnSO₄·7H₂O 0.00016% を含む培地を基礎培地として、上記の炭素源を下記の濃度に添加した培地 125 ml を 500 ml 容の坂

口フラスコに分注して、120℃で20分間、加圧滅菌して冷却し、これに、放線菌 ME561-04 株の培養から胞子および菌糸を接種し、27℃で好氣的に振盪培養した時、培養3日目または4日目のマゼスラマイシン化合物の生産量は第4表に示す通りである。

第 4 表

炭素源の種類と濃度	培養日数	生産量
グリセリン 2.5 %	3 日	150 μg/ml
グルコース 2 %	3	93
ガラクトース 2 %	3	3
ラクトース 2.5 %	3	7
デキストリン 2 %	3	13
マルトース 2 %	3	9
サツカロース 4 %	4	5
グルコース 1 %	3	46
澱粉 1 %		
大豆油 2 %	3	28
澱粉 0.5 %		
グルコース 0.5 %		

上記の様に、いずれの炭素源もこれらの化合物の生産に利用できるが、特にグリセリン、グルコースが好適な炭素源である。

窒素源としてはマゼスラマイシン化合物の生産のために、放線菌の栄養源として用いられる公知の窒素源はすべて利用できる。例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、大豆粉、大豆粕、コーンステイブリーカー、綿実粉、魚粉、カザミノ酸、N-Z-アミン等が利用できるが、その一例を第5表に示す。上記の様にグルコース 1%、澱粉 1%、NaCl 0.3%、CaCO₃ 0.32%、MgSO₄·7H₂O 0.1%、CuSO₄·5H₂O 0.00056%、FeSO₄·7H₂O 0.00008%、MnCl₂·4H₂O 0.00064%、ZnSO₄·7H₂O 0.00016% を含む培地を基礎培地として、下記の濃度になる様に窒素源を添加して滅菌し、これに前記の液体培地に発育せしめた胞子または菌糸を接種して3日間または4日間振盪培養した時のマゼスラマイシン化合物の生産量は第5表に示す通りである。

表 3

培養基の種類と濃度		培養日数	生産量
肉エキス	0.75%	3	150mg/ml
ペプトン	0.75%		
酵母エキス	0.2%	3	28
大豆粉	2.5%		
酵母エキス	0.5%	4	31
大豆粉	2.0%		
大豆粉	1.5%	3	25
(プロリツチ)			
コーンステアープリカ	2.0%	3	56
綿実粉	1.5%	3	14
L-アスパラギン	0.2%		
魚粉	2.0%	3	46
酵母エキス	0.5%	3	38
カザミノ酸	0.5%		
酵母エキス	0.3%	3	5
N-Z-アミン	1.0%		
大豆粉(プロリツチ)	2%	4	75
ペプトン	0.2%		

バチルス・サブチリス PCI219などを使用して、抗生物質の定量に用いられる通常の円筒平板法によつて行ない、本発明で得られた純粋なマゼスラマイシン B を標準物質に用いる。培養液中に他の抗生物質例えばチオオルチン、オーレオスリシンなどが同時に生産される時は、その培養液を酢酸エチルなどの溶媒に抽出し、残りの水層を上記の円筒平板法によつて測定することにより、マゼスラマイシン化合物を定量することができる。この場合、マゼスラマイシン化合物も酢酸エチルなどの溶媒に一部移行するので、マゼスラマイシンを対照として同じように操作し、標準曲線を作製し、これにより定量することができる。

マゼスラマイシン化合物の生産菌の培養液からこの抗生物質を抽出するには、ブタノールなどの水非混和性有機溶媒を使用する溶剤抽出法および活性炭などを吸着剤として使用する吸着法によつて行なわれる。マゼスラマイシン B のブタノール-水における分配係数は、 $\text{pH} 6 \sim 8$ の範囲で 10 以上を示す。従つて、この pH 範囲で培養物

上記の様に、いずれの培養基も利用できるが、特に、肉エキス、ペプトンが好適な培養基である。マゼスラマイシン化合物を生産せしめるために必要とするならば無機塩、金属塩、重金属塩の微量を加える。又培養中に消泡を必要とする時はシリコン樹脂、大豆油、アデカノール等の消泡剤を使用できる。

マゼスラマイシン化合物の大量生産には液体培養が好ましく、培養温度は生産菌が発育し、マゼスラマイシン化合物を生産する範囲で適用し得るが、殊に好ましいのは $25 \sim 35^\circ\text{C}$ である。培養は普通マゼスラマイシン化合物が充分蓄積されるまで継続される。例えばグリセリン 1.5%, 綿実粉 1.5%, NaCl 0.3%, L-アスパラギン 0.2% の培地を $\text{pH} 7.4$ に調整し、これに放線菌 ME 561-8 株の斜面培養から胞子および菌糸を接種し、 27°C で好氣的に攪拌培養を行つたところ、培養 2~4 日目に目的の抗生物質の最高の蓄積が見られる。

マゼスラマイシン化合物の定量は試験菌として

中よりマゼスラマイシン化合物を抽出することができる。また、培養液中のマゼスラマイシン化合物を抽出するに当り、吸着剤として、活性炭および非イオン交換性多孔質樹脂などを用いることは、有効である。特にジビニルベンゼンで架橋したポリスチレン樹脂、アンバーライト XAD-2 米国ロームアンド・ハース社製を用いるカラムクロマトグラフィーを行うことは好ましく、XAD-2 に吸着した抗生物質はメタノール水、アセトン水などで溶出され、減圧蒸溜によつて濃縮される。菌体等固形分中のマゼスラマイシン化合物は通常もちいられる有機溶剤例えばメタノール、エタノール、アセトン、ブタノール等に抽出され、減圧蒸溜によつて濃縮される。菌体を含む培養液から菌体を除くことなくマゼスラマイシン化合物がよく溶ける溶剤、例えばブタノールに液体部分および菌体部分のマゼスラマイシン化合物を抽出することもできる。上記の様にして得た抽出乾固物はエチルエーテル、ノルマルヘキサン等で処理すると、マゼスラマイシン化合物は不溶部に移行

する。さらにこの不溶部をメタノールで抽出すると、ろ液層にマゼスラマイシン化合物は抽出され、残渣は不純物として除かれる。マゼスラマイシンはこれらの抽出液を適宜に組合せあるいは繰返すことによつて精製することができるが、更にセフアデックスLH-20（フアルマシア社製）、セルロースおよびシリカゲルなどを用いる通常のカラムクロマトグラフィーによつて精製される。培養物中にしばしば共存する既知抗生物質チオルチンおよびオーレオスリシンは上述のエチルエーテル、ノルマルヘキサン等による処理またはシリカゲルのカラムクロマトグラフィーによつて容易にマゼスラマイシン化合物と分離することができる。

上記した抽出精製処理は必要に応じて単独或いは任意に組み合わせることにより、マゼスラマイシン化合物を精製することができる。マゼスラマイシンA、B、Cを非極性溶媒中で加熱濃縮して脱水することにより、アンヒドロマゼスラマイシンが得られる。ここで用いられる非極性溶媒としては、例えば、アセトン、アセトニトリル、酢酸

エチル、クロロホルム等である。アンヒドロマゼスラマイシンを水または含水の非アルコール性溶媒に溶解すると、水が添加されてマゼスラマイシンAが得られる。マゼスラマイシンAまたはアンヒドロマゼスラマイシンをメタノールに溶解するとメタノールが反応して比較的安定なマゼスラマイシンBに変換することができる。同様に、マゼスラマイシンAまたはアンヒドロマゼスラマイシンをエタノールに溶解すると、エタノールが反応して比較的安定なマゼスラマイシンCが得られる。

従つて、第三の本発明の要旨とするところは、マゼスラマイシンAまたはアンヒドロマゼスラマイシンをメタノールまたはエタノールと反応させることからなる、マゼスラマイシンBまたはCの製造法にある。

マゼスラマイシン生産菌の培養液からマゼスラマイシンを採取するために、上記抽出精製法を有効に組合せた一例をあげると次の通りである。培養液をpH8に調整し、ブタノールで、抗生物質を抽出し、水を加えて減圧下に40℃以下で

濃縮しブタノールを完全に除去し水溶液とする。これをpH7.5に調整しアンバーライトXA D-2の塔に吸着させ、充分水洗後50%アセトン水で萃出される。これを減圧下に40℃以下で濃縮乾固して粗粉末を得る。これを少量のメタノールに溶かし、メタノールに不溶の夾雑物は遠心分離または伊過により除きシリカゲルを加え、均一に混合した後乾燥したものを、シリカゲルを展開溶剤で懸濁してつめたカラムの頂部に置き、次にクロロホルム-メタノール（100：5容）で展開する。活性溶出部を濃縮後メタノールに溶解し、冷蔵庫に放置すると、黄色針状晶としてマゼスラマイシンBを得ることができる。

夾雑物が多く結晶が析出しにくい時はシリカゲルの再クロマトグラフィーを展開溶剤に酢酸エチルを用いて行い、活性溶出部を濃縮後メタノールに溶解し、冷蔵庫に放置するとマゼスラマイシンBの結晶を得ることができる。

以下に、マゼスラマイシン化合物の製造法に関する実施例を示すが、本発明により、マゼスラマ

イシンA、B、Cおよびアンヒドロマゼスラマイシンの性状が明らかにされたのでこの性状に基いてマゼスラマイシン化合物の製造法を種々考察することができる。

従つて、本発明は実施例に限定されるものではなく実施例の修飾手段は勿論、本発明によつて明らかにされたマゼスラマイシン化合物の性状に基いて公知の手段を施してマゼスラマイシンA、B、Cおよびアンヒドロマゼスラマイシンを生産、濃縮、抽出、精製する方法をすべて包括する。

実施例1

寒天斜面培地に培養した放線菌ME561-04株（微工研菌寄第3825号）をグリセリン1.5%、綿実粉1.5%、L-アスパラギン0.2%、食塩0.3%を含む液体培地に接種し、27℃で48時間振盪培養して1次種培養を得た。次に上記組成の液体培地5ℓを500ml容量の坂口フラスコに125mlずつ分注したものに1次種培養液1mlずつを接種し、27℃で4日間振盪培養した。pH7.6の培養液4.740mlを得た。伊液は46μg/ml

(全量216mg)の量でマゼスラマイシン化合物を含んでいた。伊通で分けられた菌体は215gで60mgのマゼスラマイシン化合物を含んでいた。上記培養液4740mlのPHを水酸化ナトリウムで8.0に調整し、5000mlのブタノールを加えて攪拌抽出し、減圧濃縮し、精製水1600mlに溶解した。マゼスラマイシン化合物の89%にあたる191gがブタノール抽出により得られ、その水溶液のPHは4.5であつた。水酸化ナトリウムでPHを7に調整し、アンバーライトXAD-2(400ml、3.2×50cm)のカラムを通過させた。カラムを精製水3000mlを通過させることにより洗滌し、50%アセトン水2000mlにより、マゼスラマイシン化合物を溶出せしめ、減圧下で濃縮乾固し、14gの褐色粉末を得た。184gのマゼスラマイシン化合物(マゼスラマイシンAが主体)を含有したこの褐色粉末を少量のメタノールに溶解し、シリカゲル(ワコゲルC-200)4gを加え均一に混合した後、減圧下で乾燥する。これをクロロホルムでシリカゲル

分画23~39にマゼスラマイシンBが溶出された。この分画を減圧濃縮して、61gのマゼスラマイシンBの純粋な乾燥粉末を得た。これを、加温しながら6mlのメタノールに溶解した後、冷却し、マゼスラマイシンBの結晶40gを得た。

実施例4

寒天斜面培地に培養した放線菌ME-561-04株(微工研菌寄第3825号)をグリセリン2.5%、牛肉エキス0.5%、ポリペプトン0.5%、酵母エキス1.0%、食塩0.2%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%、 K_2HPO_4 0.05%、沈降性炭酸カルシウム0.32%を含む液体培地5ℓを、500ml容のワツフル付三角フラスコに110mlずつ分注したものを用いて、27℃、4日間回転培養した。PH5.6の培養液3530mlおよび菌体1160gを得た。菌体はメタノール2500mlを加えて攪拌抽出し、抽出液を減圧濃縮し、水500mlに溶解し、培養液と合わせた。以下、実施例1と同様の方法でブタノール抽出、アンバーライトXAD-2処理を行ない、22gの粗粉末を得た。この粗粉末を

50gを懸濁してつめたカラム(内径20mm)の頂部に置く。次にクロロホルム-メタノール(50:1容)250mlを通過させ、次にクロロホルム-メタノール(20:1容)で展開し、15gずつ分画採取する。分画32~45にマゼスラマイシンBが溶出された。この分画を減圧濃縮して、マゼスラマイシンB71gを含有する黄土色粉末118gを得た。収率は33%であつた。

実施例2

実施例1で得られた黄土色粉末118gを60℃で50mlのメタノールに溶解した後、冷却し、マゼスラマイシンBの針状結晶46gを得た。結晶化の収率は65%であつた。

実施例3

実施例1と同様の方法で得た乾燥粉末115gをメタノール1mlに溶解し、シリカゲル1gを加え均一に混合した後、減圧下で乾燥する。これを酢酸エチルでシリカゲル11gを懸濁してつめたカラム(内径14mm)の頂部に置く。次に酢酸エチル600mlで展開し、7gずつ分画採取する。

実施例1の2倍のスケールでシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行ない、マゼスラマイシンBを含む分画を集めて、減圧濃縮し、150gのマゼスラマイシンBの純粋な粉末を得た。これをジメチルホルムアミド2mlを加えて溶解し、メタノール35mlを加えて、冷却し、マゼスラマイシンBの針状結晶68gを得た。

実施例5

マゼスラマイシンBの結晶124gをアセトニトリル100mlに溶解し、極微量のアンバーライトCG-50を添加して、1時間静置した。アンバーライトCG-50をグラスフィルターで伊通して除去し、アセトニトリルを減圧濃縮により除去していくと、針状結晶が析出した。これをアセトニトリルより再結晶し、80gのアンヒドロマゼスラマイシンの結晶性粉末を得た。

なお、マゼスラマイシンCの結晶60gをアセトニトリル50mlに溶解して上記と同様に処理すると、38gのアンヒドロマゼスラマイシンの結晶性粉末を得た。

実施例 6

実施例 5 で得られたアンヒドロマゼスラマイシンの 50 町を 50 町アセトン水 50 ml で溶解し、減圧下濃縮すると、マゼスラマイシン A を得た。

実施例 7

実施例 6 で得られたマゼスラマイシン A の 50 町を 15 ml のメタノールに溶解し、減圧下濃縮してマゼスラマイシン B の結晶 48 町を得た。

実施例 8

マゼスラマイシン A の 50 町を 15 ml のエタノールに溶解し、減圧下濃縮してマゼスラマイシン C の結晶 45 町を得た。

実施例 9

実施例 5 で得られたアンヒドロマゼスラマイシンの 50 町を 15 ml のメタノールに溶解し、減圧下濃縮して、マゼスラマイシン B の結晶 32 町を得た。

実施例 10

実施例 5 で得られたアンヒドロマゼスラマイシンの 21 町をエタノール 30 ml に溶解し、減圧下

濃縮して、マゼスラマイシン C の結晶性粉末 24 町を得た。

4 図面の簡単な説明

第 1 図はマゼスラマイシン A の 4 / 4 μg / ml のアセトニトリル溶液中での紫外部吸収スペクトル曲線を示す。第 2 図はマゼスラマイシン A の臭化カリウムで測定した赤外部吸収スペクトル曲線を示す。第 3 図はマゼスラマイシン B の 5 μg / ml の 1 町メタノール溶液および 0.1 N 水酸化ナトリウム含有 1 町メタノール溶液中での紫外部吸収スペクトル曲線を示す。第 4 図はマゼスラマイシン B の臭化カリウムで測定した赤外部吸収スペクトル曲線を示す。第 5 図は、マゼスラマイシン B の重ジメチルスルフォキシド溶液で測定した核磁気共鳴スペクトル曲線を示す。

第 6 図はマゼスラマイシン C の 5 μg / ml のアセトニトリル溶液中での紫外部吸収スペクトル曲線を示す。

第 7 図はマゼスラマイシン C の臭化カリウムで測定した赤外部吸収スペクトル曲線を示す。第 8 図

はアンヒドロマゼスラマイシンの 5 μg / ml のアセトニトリル溶液中での紫外部吸収スペクトル曲線を示す。第 9 図はアンヒドロマゼスラマイシンの臭化カリウムで測定した赤外部吸収スペクトル曲線を示す。

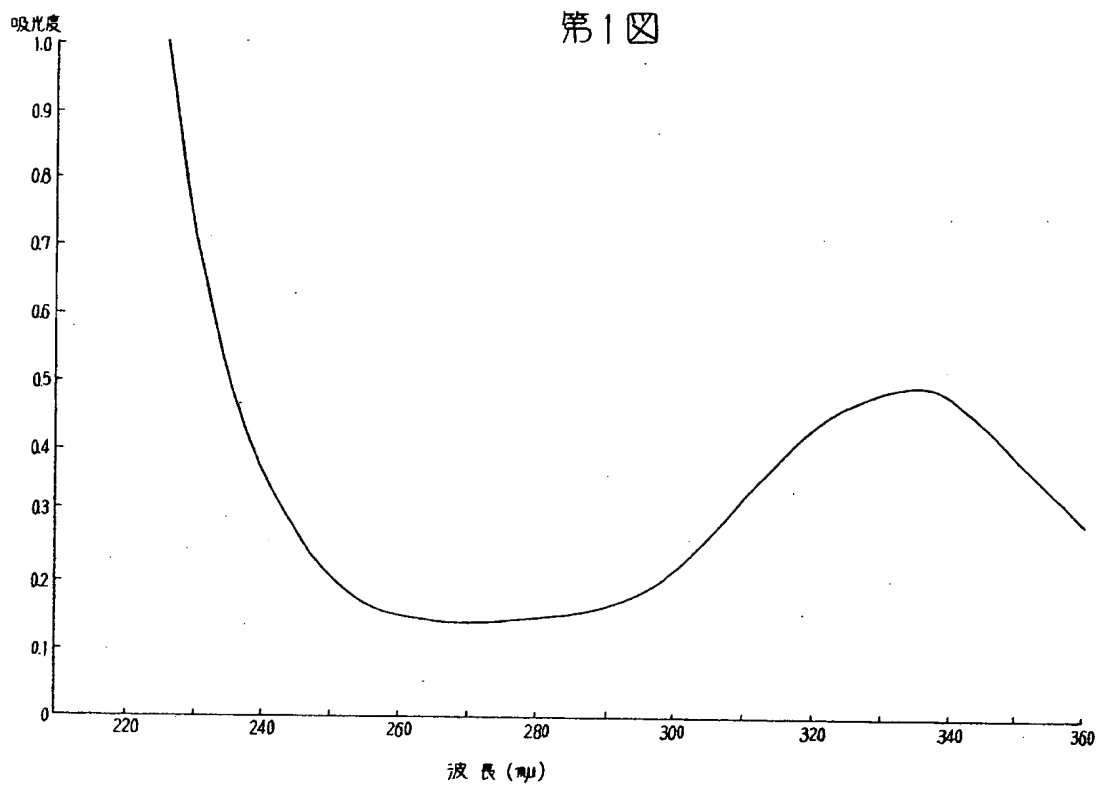
代理人 朝 内 忠 夫

代理人 八 木 田

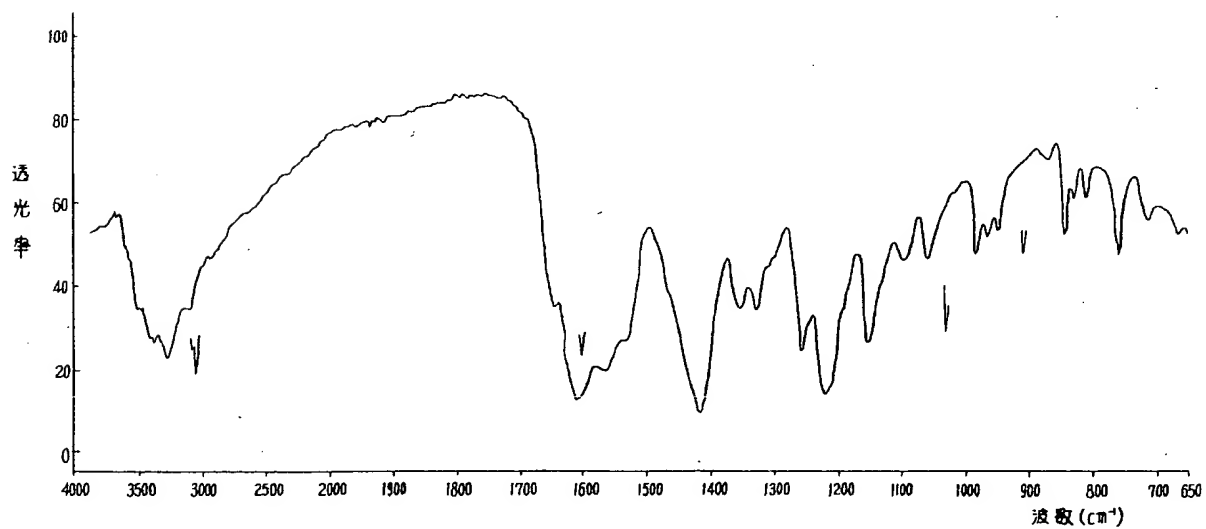
代理人 氏 野 孝 雄

代理人 森 田 哲

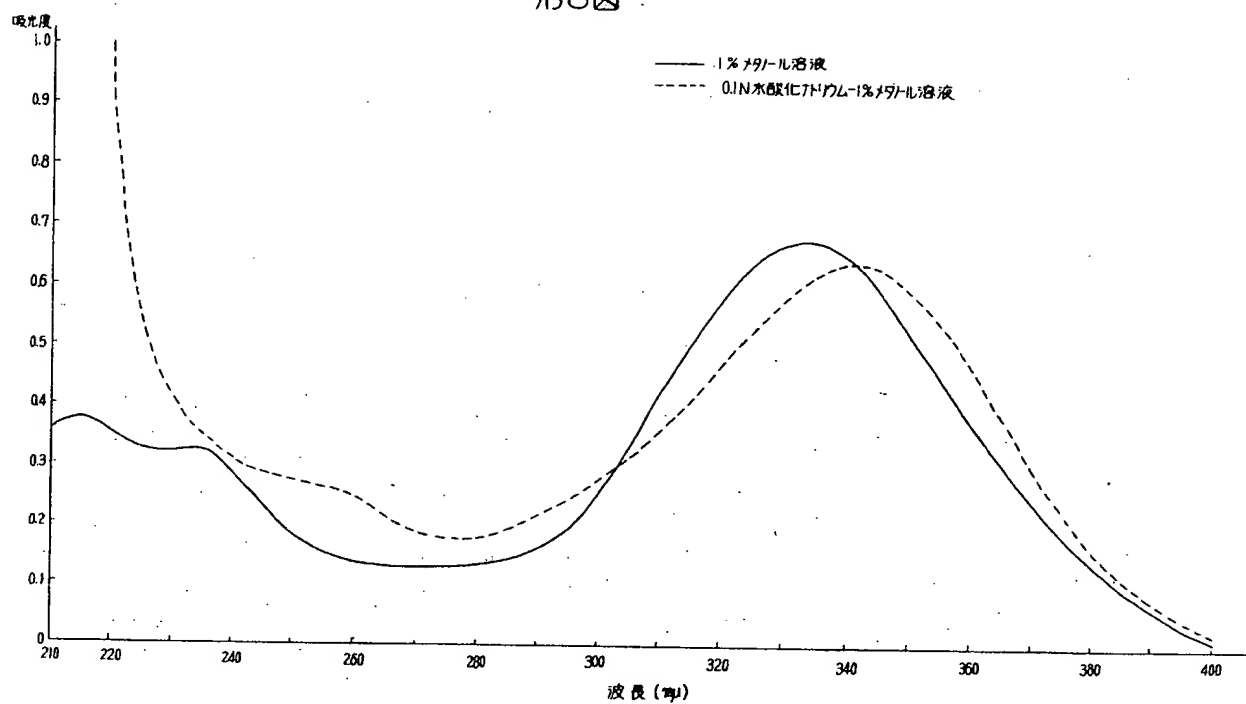
第1図



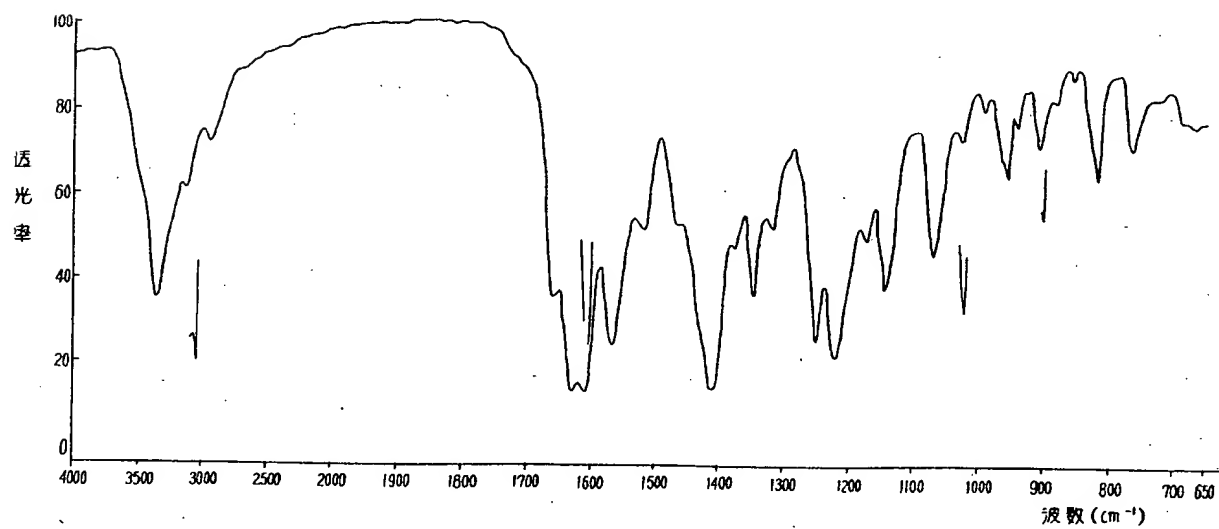
第2図



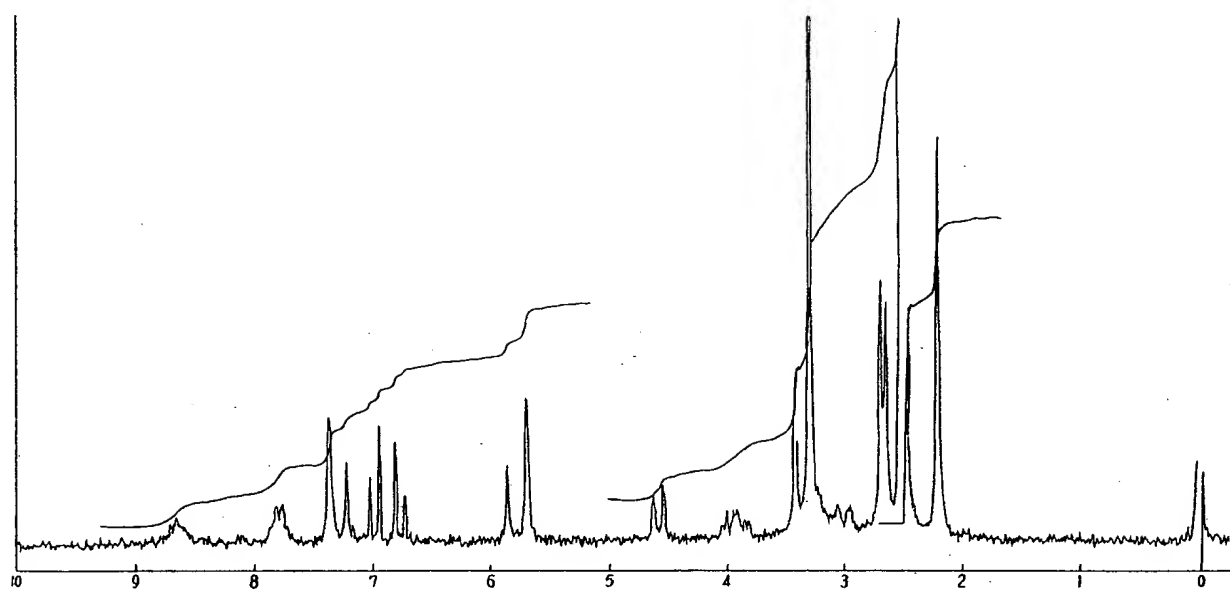
第3図



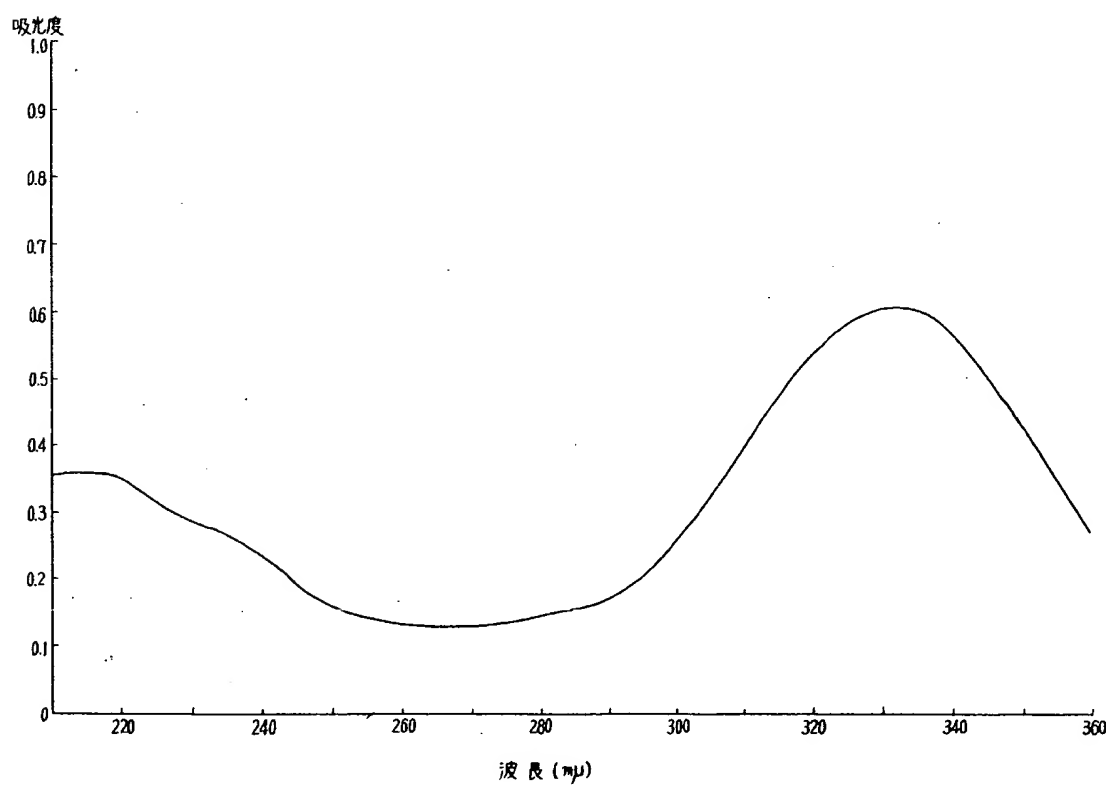
第4図



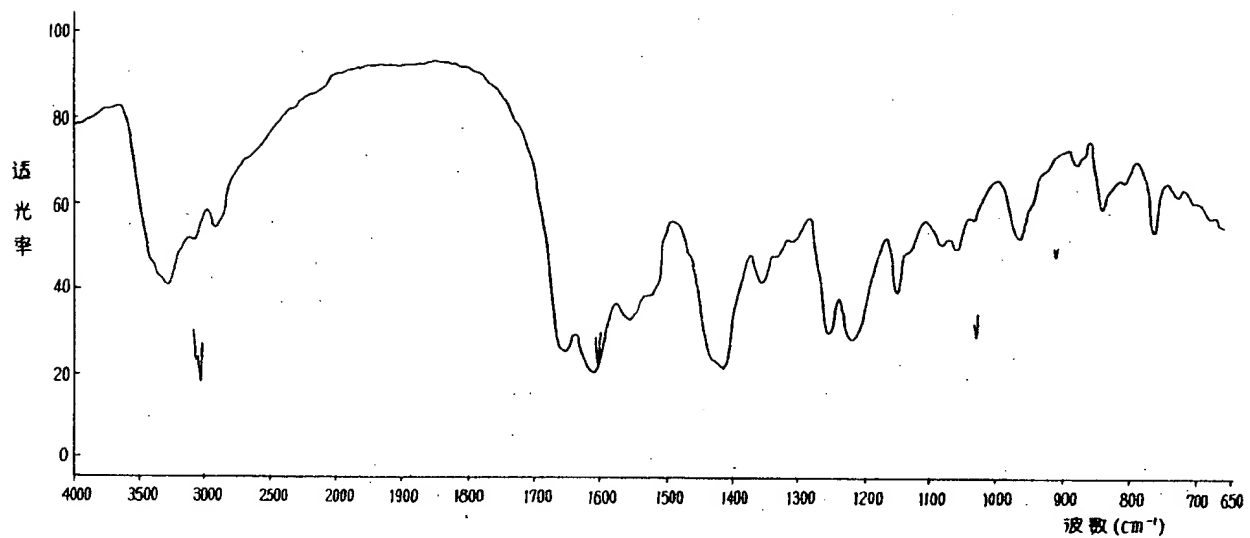
第5図



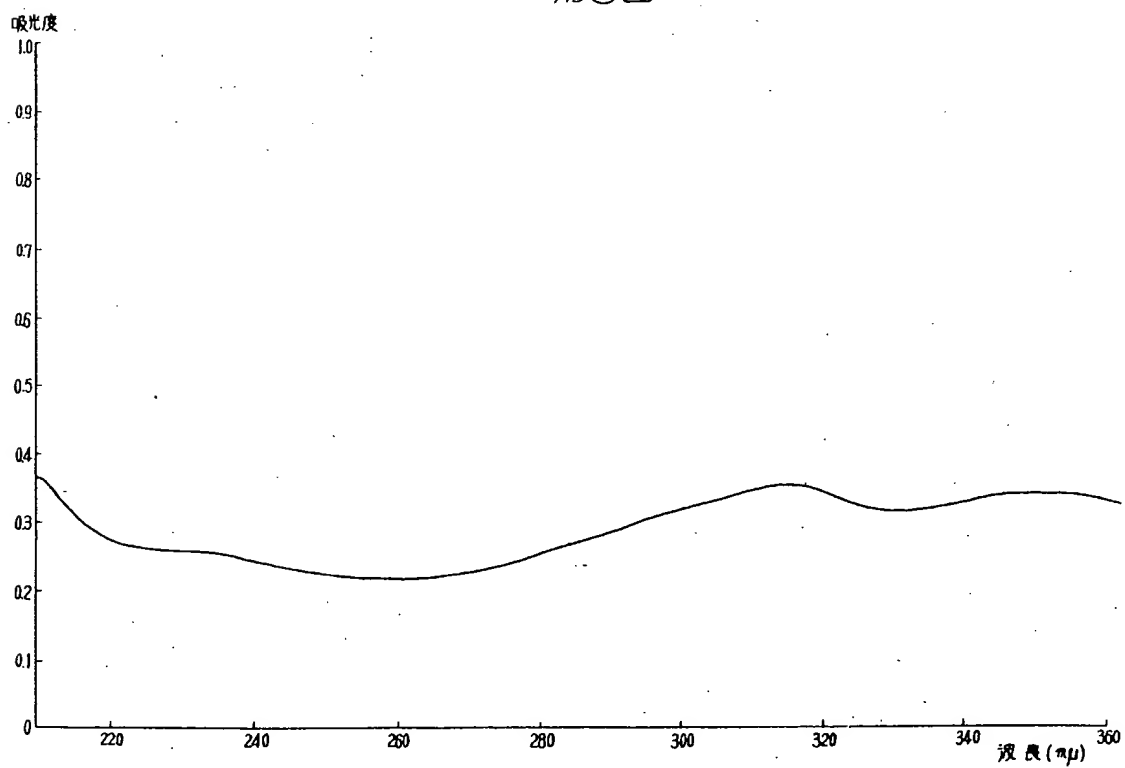
第6図



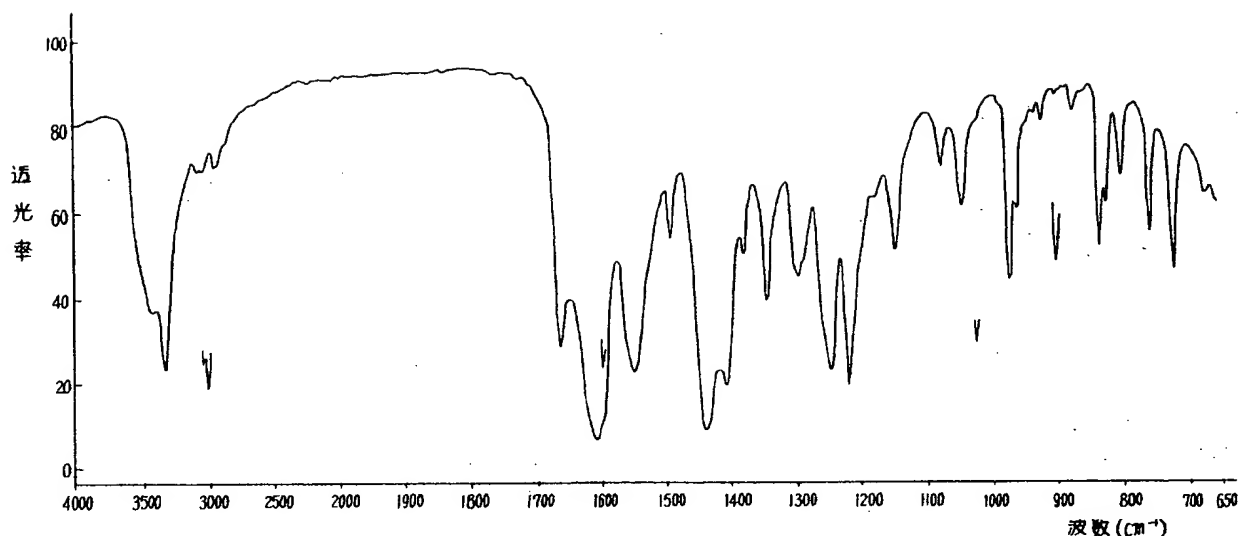
第7図



第8図



第9図



手続補正書 (自発)

昭和52年3月29日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和51年特許願第157479号

2. 発明の名称

新制癌抗生物質マセスラマイシン及び
その製造方法

3. 補正をする者

事件との関係

特許出願人

住所 東京都品川区上大崎3丁目14番23号

名称 財団法人微生物化学研究会

4. 代理人

住所 東京都港区西新堀1丁目1番15号、物産ビル別館

(6145) 氏名

朝内 忠 夫

と補正の対称

明細書の特許請求の範囲の欄および発明の詳細な説明の欄

と補正の内容

- (1) 明細書の特許請求の範囲を別紙の通り補正する。
- (2) 明細書の第7頁下から7行の「アンヒドロアンス」を「アンヒドロマセス」と補正する。
- (3) 同第9頁5行の「34600」を「34,600」と補正する。
- (4) 同第9頁6行の「39,400)」を「(39,400)」と補正する。
- (5) 同第10頁5行の「12.40%」の次に及び第10頁7~8行の「メタノール」の次に「,」を挿入する。
- (6) 同第10頁7行の「1224%」を「12.24%」, 「1864%」を「18.64%」と補正する。
- (7) 同第11頁3行の「屑」の次に「e」を挿入する。
- (8) 同第11頁下から9行の「ジメチルスルホキ

シサイ」を「ジメチルスルホキサイ」と補正する。

(9) 同第13頁6行の「0.067」の次に「,」を挿入する。

(10) 同第13頁8行の「25.700」を「25,700」と補正する。

(11) 同第13頁9行の「19.300」を「19,300」と補正する。

(12) 同第13頁下から3行の「観察」の前に「が」を挿入する。

(13) 同第14頁10行の「550」を「5.50」と補正する。

(14) 同第14頁下から8行の「311,115」を「311,115」と補正する。

(15) 同第14頁下から8行の「815」を「8.15」と補正する。

(16) 同第15頁8行の「アルカノール」を「アルコール」と補正する。

(17) 同第15頁下から2行の「各々の」の次に「供試菌に対する」を挿入する。

(18) 同第16頁の第1表を次の通り補正する。

表 / 供試菌

供試菌	最低阻止濃度 (mg/ml)
スタヒロコツカス・アウレウス 209P	3.12
スタヒロコツカス・アウレウス・スミス	1.56
ミクロコツカス・フラバス PDA16	3.12
ミクロコツカス・リゾチイグライクス IPO3333	3.12
サルチナ・ルサア POI1001	3.12
バチルス・アンヌラシス	6.25
バチルス・ズブチリス NRR1 B-558	3.12
バチルス・ズブチリス POI219	1.56
バチルス・セレウス AT0010702	6.25
コリネバクテリウム・ボビス 1810	3.12
エシエリヒア・コリ N18J	6.25
エシエリヒア・コリ K-12	50
シダラ・シセンタリヒ JB11910	3.12
シダラ・フレキシネリ 40 JB11811	50
シダラ・シンネイ JB11746	100
サルモネラ・チフイ T-63	50
サルモネラ・エンテリチイシジリス 1891	6.25
プロテウス・ブルガリス OX19	25
プロテウス・レトグリ GN466	50
シユードモナス・エルネストーザ A3	>50
クレブシラ・ニューモニエ POI602	3.12
カンジダ・シユードトロピカリス NI7494	6.25
カンジダ・アルビカニス 3147	>25
カンジダ・クルセイ NI-7492	>50
サツカロミセス・セレビスヒ	>25
クリプトコッカス・ネオホルマニス NI-7496	>12.5
ヘルミンソスボリウム・オリゼ	>12.5
ビリクテリヤ・オリゼ	6.25
キサントモナス・シトリ	>25
キサントモナス・オリゼ	1.56
アスベルギルス・ニガー	>50
トリコフィータ・アスタロイデス 429	12.5

14 同第 17 頁下から第 4 行の式を次の通り補正する。

$$\text{「 死亡率(\%) = } \frac{\text{(処理マスの生存日数)}}{\text{(未処理マスの生存日数)}} \text{」}$$

15 同第 19 頁下から 8 行の「 / 1/2 Me 」を「 / 1/2 me 」と補正する。

16 同第 19 頁下から 7 行の「 parchment 」を「 Parchment 」と補正する。

17 同第 19 頁下から 4 行の「 I S P 」を「 ISP 」と補正する。

18 同第 19 頁下から 2 行の「 Yellow Maple 」を「 Yellow MapLe 」と補正する。

19 同第 19 頁末行の「 ~ 4 pi 」を「 ~ 4 pi 」と補正する。

20 同第 20 頁 1 行の「 / ba 」および「 2 ba 」をそれぞれ「 / ba 」および「 2 ba 」と補正する。

21 同第 20 頁下から 10 行の「 p 1 」および「 n 1 」をそれぞれ「 p 1 」および「 n 1 」と補正する。

22 同第 20 頁下から 9 行の「 J p 1 」を「 J p 1 」と補正する。

23 同第 20 頁下から 8 行の「 YellowTint ~ 2 ba 」を「 Yellow Tint ~ 2 ba 」と補正する。

24 同第 20 頁下から 4 行の「 Yellow 」を「 Yellow 」と補正する。

25 同第 21 頁 3 行の「 parchment 」を「 Parchment 」と補正する。

26 同第 21 頁 8 行の「 2 cb 」を「 2 cb 」と補正する。

27 同第 21 頁下から 4 行の「 J ng, Yellow 」を「 J ng, Yellow 」と補正する。

28 同第 21 頁下から 5 行の「 2 cb 」を「 2 cb 」と補正する。

29 同第 22 頁 1 行の「 pearl 」を「 Pearl 」と補正する。

30 同第 23 頁下から 7 行の「 (4) 」を「 (3) 」と補正する。

31 同第 23 頁下から 4 行の「 れがその信用は 」を「 れるが、その作用は 」と補正する。

32 同第 24 頁 4 行の「 I S P 」を「 ISP 」と補正する。

33 同第 24 頁 10 行の「 思は 」を「 思わ 」と補正する。

34 同第 24 頁下から 8 行の「 I sp 」を「 ISP 」と補正する。

35 同第 25 頁 5 行の「 要求 」を「 要約 」と補正し、また「 56 / ... 24 」を「 56 / - 24 」とそれぞれ補正する。

36 同第 25 頁 11 行の「 分解 」を「 分解力 」と補正する。

37 同第 25 頁下から 3 行の「 Systemetic 」を「 Systematic 」と補正する。

38 同第 25 頁 22 行の「 The Japomese 」を「 The Japanese 」と補正する。

39 同第 27 頁の第 3 表を次表の通り補正する。

表 3

MSJ61-24	ストレプトミセス・チオ サルチウス IBP 3037	文 献 記 号
菌生枝の形成	+	(1)
塊状形成	-	(1)
胞子の表面	平 滑	平 滑(2)
気 菌 糸	黄 灰 灰	-あるいは白〜黄灰色(1)
発育の色	りす黄〜りす黄茶〜黄茶	クリーム〜黄灰色(1)
溶解性色素	-	黄 茶 (1)
メラニン色素の生成	-	- (3)
ISB-1/培地	-	- (3)
ISB-6	+	- (3)
ISB-7	+	- (1)
スターチの加水分解	極めて弱い	+はやい(1)
牛乳の凝固	+はやい	+おそい(1)
・のペプトン化	+強い	+おそい(1)
ゼラチンの液化	+	+おそい(1)
真綿ゼラチン	中等度〜弱い	- (1)
グルコース・ペプトン・ゼラチン	-	(3)
硫酸塩の還元反応	+	-
炭素源の利用性	-	-
・-アラビノース	-	-
D-キシロース	+	+
D-グルコース	-	-
D-フラクトース	-	-
シユクロロース	-	-
イノシトール	±	±
L-アラニン	-	-
ラフィノース	-	-
マンニトール	-	-
生産する抗生物質	オーレオスライシン	オーレオスライシン(1)

注(1)：±はおそく、+はおそく〜を意味する。

注(2)：文献記載は(1) B.A. Wakeman 著の The Actinomycetes, 3巻, 379頁,

1961; (2) Electronmicrographs of Actinomycetes No. 1, 14頁,

The Society for Actinomycetes, Japan 1963;

(3) International Journal of Systematic Bacteriology, 22巻,

363頁, 1972

例 同第28頁8行の「ス・ペプトン」を「ス、ペプトン」と補正する。

例 同第28頁10行の「streptomycetes」を「Streptomycetes」と補正する。

例 同第29頁2行の「不菌種」を「本菌種」と補正する。

例 同第29頁下から7行の「表1」を「表4」と補正する。

例 同第29頁下から6行の「NaCl」を「NaCl」と補正する。

例 同第29頁下から5行の「CaCO₃ 0.32%」を「CaCO₃ 0.32%」と補正する。

例 同第30頁第4表中の下から5行の「グルコース 1%」の下のアンドーラインを削除する。

例 同第31頁下から8行の「CaCO₃ 0.32%」を「CaCO₃ 0.32%」と補正する。

例 同第32頁下から6行の「PH」を「pH」と補正する。

例 同第34頁下から2行および末行の「PH」を「pH」とそれぞれ補正する。

例 同第35頁7行の「米国ロームアンド・ハース社製」を「(米国ローム・アンド・ハース社製)」と補正する。

例 同第36頁10行の「オーレオスリシン」を「オーレオスライシン」と補正する。

例 同第36頁下から3行の「脱水」の次に「又は脱アルコール」を挿入する。

例 同第37頁下から2行及び第38頁2行の「PH」を「pH」と補正する。

例 同第38頁4行の「される」を「させる」と補正する。

例 同第39頁下から2行の「PH」を「pH」と補正する。

例 同第40頁4行、9行及び10行の「PH」を「pH」とそれぞれ補正する。

例 同第40頁6行の「1600 ml」を「1,600 ml」と補正する。

例 同第41頁7行および10行の「黄土色 粉」を「黄土色粉」と補正する。

例 同第42頁7行の「ME-」を「ME」と補正す

る。

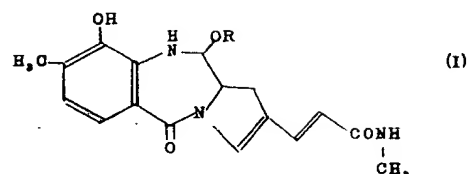
例 同第 4 頁下から 7 行の「PH」を「pH」と補正する。

例 同第 4 頁下から 6 行および 5 行の「3530」、「1160」、「2500」をそれぞれ「3,530」、「1,160」、「2,500」と補正する。

例 同第 4 頁下から 7 行の「スルフォキサイド」を「スルホキサイド」と補正する。

2 特許請求の範囲

1 次の一般式(I)



(式中 R は水素原子または低級アルキル基、特にメチル基またはエチル基を示す) で表わされる化合物またはこれのアニドロ体である制菌抗生物質マゼスラマイシン化合物。

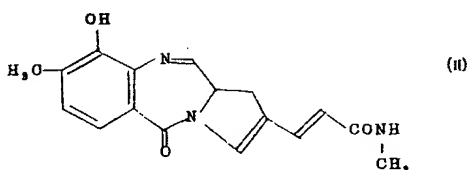
2 一般式(I)の化合物において R が水素原子で表わされるマゼスラマイシン A である特許請求の範囲第 1 項記載の化合物。

3 一般式(I)の化合物において R がメチル基で表わされるマゼスラマイシン B である特許請求の範囲第 1 項記載の化合物。

4 一般式(I)の化合物において R がエチル基で表わされるマゼスラマイシン C である特許請求の

範囲第 1 項記載の化合物。

5 一般式(I)の化合物のアニドロ体であつて次式(II)



で表わされるアニドロマゼスラマイシンである特許請求の範囲第 1 項記載の化合物。

6 ストレプトミセス属に属するマゼスラマイシン化合物生産菌を、栄養源を含有する培地中で好氣的に培養して、その培養物中にマゼスラマイシン化合物を生産せしめ、培養物からマゼスラマイシン化合物を採取することを特徴とする、抗生物質マゼスラマイシン化合物の製造法。

7 ストレプトミセス・チオルテウス ME 561-2 株(彼工研菌第 3525 号)を栄養源培地中で 25~35°C の温度範囲で好氣的に培養し

て、その培養物中にマゼスラマイシン化合物を生産せしめる特許請求の範囲第 6 項記載の方法。

8 マゼスラマイシン化合物生産菌の培養物から水非混和性の有機溶剤で抽出によつてマゼスラマイシン化合物を採取する特許請求の範囲第 6 項記載の方法。

9 マゼスラマイシン化合物生産菌の培養液から吸着剤、特に活性炭または多孔質樹脂に吸着せしめてマゼスラマイシン化合物を採取する特許請求の範囲第 6 項記載の方法。

10 マゼスラマイシン化合物を含有する粉末を採取し、この粉末をメタノール又はメタノールを含有する混合溶媒で抽出してマゼスラマイシン B を採取する特許請求の範囲第 6 項記載の方法。

11 マゼスラマイシン B を採取し、非極性溶媒中で脱メタノールして、アニドロマゼスラマイシンを採取する特許請求の範囲第 6 項又は第 7 項記載の方法。

12 アニドロマゼスラマイシンを採取し、含水溶媒に溶解して、マゼスラマイシン A を採取す

手続補正書 (自発)

昭和 52 年 5 月 20 日

る特許請求の範囲第 6 項記載の方法。

13 アンヒドロマゼスラマイシンを採取し、エタノールを含有する溶液に溶解して、マゼスラマイシン C を採取する特許請求の範囲第 6 項記載の方法。

14 マゼスラマイシン A またはアンヒドロマゼスラマイシンをメタノールまたはエタノールと反応させることから成るマゼスラマイシン B または C の製造法。

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和 51 年 特 許 願 第 157479 号

2. 発明の名称

新制癌抗生物質マゼスラマイシン及びその製造方法

3. 補正をする者

事件との関係

特許出願人

住 所 東京都品川区上大崎 3 丁目 14 番 23 号

名 称 財団法人微生物化学研究会

4. 代 理 人

住 所 東京都港区西新橋 1 丁目 1 番 15 号、物産ビル別館

(6145) 氏 名 朝 内 忠 夫

5 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

6 補正の内容

- (1) 明細書第 13 頁 9 行の「43.600」を「43,600」と補正する。
- (2) 同第 14 頁下から 8 行の「311.124」を「311.126」と補正する。
- (3) 昭和 52 年 3 月 28 日差出の手続補正書第 4 頁下から 16 行の「エンテリタイテジリス」を「エンテリタイデイス」と補正する。
- (4) 同手続補正書第 4 頁下から 9 行の「NI-7492」を「NI 7492」と補正する。
- (5) 同手続補正書第 4 頁下から 7 行の「NI-7496」を「NI 7496」と補正する。
- (6) 同手続補正書第 8 頁の第 3 表中 6~7 行の「種々の培地上で気菌糸の形成なく不明」を削除し同表 3~6 行にわたって第 3 欄中に次の記載を挿入する。

「種々の培地上で
気菌糸の
形成なく
不明」

- (7) 同手続補正書第 8 頁第 3 表中の第 4 欄 6 行の「~黄茶色(1)」を「~黄茶(1)」と補正する。
- (8) 同手続補正書第 9 頁 1~2 行の記載を削除し代りに「(補) 同第 28 頁 8 行の「ス、ペプトン」を「ス・ペプトン」と補正する。」を挿入する。
- (9) 同手続補正書第 9 頁 7 行の「表 4」を削除し「第 4 表」を挿入する。

手続補正書 (自発)

昭和 52 年 7 月 28 日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和 51 年 特 許 願 第 157479 号

2. 発明の名称

新制癌抗生物質マゼスラマイシン及びその製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

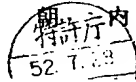
住 所 東京都品川区上大崎 3 丁目 14 番 23 号

名 称 財団法人微生物化学研究会

4. 代 理 人

住 所 東京都港区西新橋 1 丁目 2 番 9 号、三井物産館内

(6145) 氏 名



忠 夫



特開 昭53-82792(24)

5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

6. 補正の内容

- (1) 明細書第 12 頁 2 行の「2.05」を「2.66」と補正する。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)